

(19) BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

(12) **Offenlegungsschrift**  
(10) **DE 195 26 561 A 1**

(51) Int. Cl. 6:  
**A 61 K 49/00**  
G 01 N 33/68  
G 01 N 33/564  
G 01 N 33/574  
A 61 K 38/10

(21) Aktenzeichen: 195 26 561.0  
(22) Anmeldetag: 20. 7. 95  
(23) Offenlegungstag: 23. 1. 97



(71) Anmelder:

Boehringer Mannheim GmbH, 68305 Mannheim, DE

(74) Vertreter:

H. Weickmann und Kollegen, 81679 München

(72) Erfinder:

Endl, Josef, Dr., 82362 Weilheim, DE; Ganz, Manfred, Dr., 86914 Waldmohr, DE; Stahl, Peter, Dr., 82347 Bernried, DE; Kientsch-Engel, Rosemarie, Dr., 82340 Feldafing, DE; Jung, Günther-Gerhard, Prof. Dr., 72076 Tübingen, DE; Pozzilli, Paolo, Prof., Rom, IT; Donie, Frederic, Dr., 82377 Penzberg, DE

(54) In-vivo-Diabetes-Test

(57) Die Erfindung betrifft die Verwendung von autoreaktiven Substanzen zur Herstellung eines Mittels für die Diagnose von zellulär vermittelten Erkrankungen oder einer Prädisposition für zellulär vermittelte Erkrankungen, wobei man das Mittel intradermal appliziert und die Diagnose auf Basis des Auftretens oder Fehlens einer positiven Reaktion am Applikationsort stellt.

## Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von autoreaktiven Substanzen zur Herstellung eines Mittels für die Diagnose von zellulär vermittelten Erkrankungen oder einer Prädisposition für zellulär vermittelte Erkrankungen, die das Immunsystem beeinflussen.

Die Aufklärung der molekularen Zusammenhänge bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen, wie etwa der rheumatoiden Arthritis und des juvenilen Diabetes (IDDM) ist innerhalb der letzten Jahre schnell fortgeschritten und läßt mittlerweile konkrete Anwendungen für die frühe Diagnose und eine kausale Therapie dieser Erkrankungen erkennen.

Heute gilt als gesichert, daß bei der Entstehung dieser Erkrankungen neben einer genetischen Disposition auch Umweltfaktoren eine Rolle spielen. Auf der Ebene der genetischen Risikofaktoren sind z. B. bei dem IDDM nur einige wenige Allele der MHC-Klasse II-Antigene eng mit dieser Erkrankung assoziiert. Somit besteht die Möglichkeit, über eine Analyse dieser Allele eine Risikogruppe für IDDM zu definieren (vgl. z. B. Thomson et al., Am. J. Hum. Genet. 43 (1988), 799–816 oder Todd et al., Nature 329 (1987), 599–604).

Bei den an der Entstehung von IDDM beteiligten Umweltfaktoren handelt es sich wahrscheinlich um exogene, als Immunogen wirksame Peptidsequenzen. In diesem Zusammenhang werden u. a. virale Antigene, die partielle Homologien zu körpereigenen Strukturen aufweisen, diskutiert. Unter besonderen Umständen, insbesondere in der postnatalen Phase, können durch die Nahrung aufgenommene Antigene, wie z. B. Rinderserumalbumin, eine Immunantwort induzieren, welche aufgrund von Homologien zu körpereigenen Strukturen einen autoaggressiven Prozeß in Gang setzen können.

Typisch für den Krankheitsverlauf bei IDDM ist die progressive Zerstörung der Pankreas- $\beta$ -Zellen durch cytotoxische Lymphozyten. Dieser Prozeß setzt schon lange vor einer erkennbaren Störung des Glucosestoffwechsels ein. Bei einer erkennbaren Manifestation des Diabetes sind bereits über 80% der  $\beta$ -Zellen zerstört. Es wäre deshalb außerordentlich wichtig, diese autoaggressiven T-Zellen frühzeitig bei Risikopersonen zu erfassen, um die betroffenen Individuen einer kausalen Therapie zuführen zu können.

Es gilt heute als gesichert, daß die Zerstörung von körpereigenem Gewebe bei Autoimmunerkrankungen anfänglich sehr langsam verläuft. Im Anfangsstadium dieses Prozesses erkennen die autoaggressiven T-Zellen wahrscheinlich nur ein oder wenige Autoantigene. Arbeiten von Kaufman et al. (Nature 368 (1993), 69–72) und Tisch et al. (Nature 368 (1993), 72–78) an einem Tiermodell (NOD-Maus) des Typ I-Diabetes haben ergeben, daß beim spontan auftretenden Diabetes dieses Mausstammes die initiale, über T-Zellen vermittelte Autoimmunreaktion gegen die Glutaminsäure-Decarboxylase gerichtet ist. Dabei werden in der NOD-Maus anfänglich nur 1 bis 2 Epitope am C-Terminus der Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD) erkannt. Zu diesem Zeitpunkt lassen sich – wie oben ausgeführt – noch keine Veränderungen im Glucose-Metabolismus feststellen, während hingegen eine Perinsulitis bereits nachweisbar ist. Erst im weiteren Krankheitsverlauf weitet sich das Spektrum der von den autoaggressiven T-Zellen erkannten Peptide der GAD aus. Nach einer Manifestation des Diabetes sind auch präaktivierte T-Zellen gegen andere Inselzell-Antigene nachweisbar, z. B. Peripherin, Heat Shock Protein HSP 65 und Carboxypeptidase H.

Es gibt Hinweise, daß auch beim Menschen die Immunantwort gegen GAD ursächlich mit dem Entstehen des Typ I-Diabetes verknüpft ist. So lassen sich beispielsweise in etwa 80% der Prädiabetiker Autoantikörper gegen GAD nachweisen, wobei die ätiologische Rolle dieser Autoantikörper allerdings gering eingeschätzt wird. Man nimmt vielmehr an, daß beim Typ I-Diabetes eine progressive Zerstörung der Pankreas- $\beta$ -Zellen durch T-Lymphozyten vorliegt. Diese gegen GAD gerichteten T-Lymphozyten konnten bereits von mehreren Forschergruppen nachgewiesen werden (Harrison et al., J. Clin. Invest. 89 (1992), 1161; Honeyman et al., J. Exp. Med. 177 (1993), 535). Die von diesen Gruppen gefundenen T-Lymphozyten reagierten mit einem aus den Aminosäuren 208 bis 404 bestehenden Peptidfragment des GAD 67 kd Moleküls.

In EP-A-0 519 469 werden autoimmun reagierende Polypeptide aus dem humanen GAD 65 kd Molekül offenbart. Diese Polypeptide haben die Aminosequenz:

X-P-E-V-K-(T oder E)-K-Z,

wobei X eine fakultative, aus 1 bis 10 Aminosäuren ausgewählte Sequenz ist und Z eine fakultative, aus 1 bis 8 Aminosäuren ausgewählte Sequenz ist.

Auch in der europäischen Patentanmeldung Nr. 95 100 764.0 werden autoreaktive Peptidsequenzen aus der humanen GAD 65 sowie eine diese Peptide enthaltende pharmazeutische Zusammensetzung vorgeschlagen. Weiterhin wird die Verwendung dieser pharmazeutischen Zusammensetzung zur Herstellung eines Mittels für die Diagnose von Erkrankungen oder einer Prädisposition für Erkrankungen, die das Immunsystem beeinflussen, oder von Tumorerkrankungen oder einer Prädisposition für Tumorerkrankungen beschrieben.

Eine der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand darin, ein diagnostisches Verfahren für zellulär vermittelte Erkrankungen des Immunsystems, insbesondere Autoimmunerkrankungen, bereitzustellen, welches einerseits für den Patienten mit möglichst wenig Unannehmlichkeiten verbunden ist und andererseits eine schnelle und zuverlässige Diagnostik ermöglicht.

Diese Aufgabe wird gelöst durch die Verwendung von autoreaktiven Substanzen zur Herstellung eines Mittels für die Diagnose von zellulär vermittelten Erkrankungen oder einer Prädisposition für zellulär vermittelte Erkrankungen, wobei man das Mittel intradermal bzw. intracutan appliziert und die Diagnose auf Basis des Auftretens oder Fehlens einer positiven Reaktion am Applikationsort stellt.

Das erfindungsgemäße diagnostische Verfahren unterscheidet sich von gegenwärtig auf dem Markt befindlichen Verfahren, die für einen allgemeinen Test der zellvermittelten Immunität verwendet werden, dadurch, daß bei diesen Tests Fremdantigene verwendet werden, denen der Patient bereits ausgesetzt worden ist, z. B.

gereinigtes Proteinderivat (PPD), Tetanustoxoid, Candida etc. Diese Tests dienen zur Bestimmung des Allgemeinzustands des Immunsystems der Testperson. Eine Diagnose von zellulär vermittelten Erkrankungen des Immunsystems erfolgt nicht.

Bei einem anderen weit verbreiteten Test, wie etwa dem zur Bestimmung von allergischen Reaktionen verwendeten Pricktest, werden die Antigene nicht intradermal verabreicht. Eine positive Reaktion, die nicht T-Zell vermittelt ist, kann innerhalb von vier Stunden nachgewiesen werden und ist durch das Auftreten einer oberflächlichen Schwellung, nicht durch das Auftreten eines Knotens gekennzeichnet.

Gemäß vorliegender Erfindung wird ein Verfahren bereitgestellt, mit dem das Auftreten einer zellvermittelten Immunreaktion gegen autoreaktive Substanzen in vivo nachweisbar ist. Diese zellvermittelte Immunreaktion weist auf das Vorhandensein spezifischer Erkrankungen des Immunsystems, insbesondere Autoimmunerkrankungen, oder einer Prädisposition für solche Erkrankungen hin. Weiterhin kann die zellvermittelte Immunreaktion auch auf das Vorhandensein von Tumorerkrankungen oder eine Prädisposition dafür hinweisen.

Die für das erfundungsgemäße Verfahren geeigneten autoreaktiven Substanzen oder Autoantigene sind natürliche, synthetische oder rekombinante Substanzen wie etwa Nukleinsäuren, Lipide, Saccharide, Polypeptide, Proteine, Peptide sowie Komplexe davon, z. B. Komplexe von Peptiden mit Polypeptiden, z. B. MHC-Molekülen oder peptidbindenden Derivaten. Weiterhin als autoreaktive Substanzen geeignet sind spezifische immunogene Epitope, Fragmente, Analoga, Mimetika oder Derivate, die z. B. durch chemische Modifikation erzeugt sind, sowie Mischungen der obengenannten Substanzen. Die autoreaktiven Substanzen können als solche oder in einer trägergebundener Form, z. B. in Form von Lipopeptiden verabreicht werden. Die autoreaktiven Substanzen können alleine oder zusammen mit weiteren Substanzen, z. B. akzessorischen stimulierenden Komponenten oder Adjuvanten verabreicht werden. Die Autoantigene können aus natürlichen Quellen stammen, durch rekombinante DNA-Technologie oder durch synthetische Verfahren, z. B. durch Peptid-Festphasensynthese, hergestellt werden.

Das erfundungsgemäße Verfahren umfaßt die intradermale Verabreichung der betreffenden Autoantigene und die Bestimmung des Auftretens oder Fehlens einer lokalen positiven zellulären Reaktion am Applikationsort. Diese positive Reaktion wird zu einem Zeitpunkt bestimmt, der für eine T-Zell vermittelte Immunantwort charakteristisch ist, vorzugsweise zu einem Zeitpunkt von mindestens 24 h nach der Applikation, besonders bevorzugt in einem Zeitraum von 24 h bis 1 Woche nach der Applikation und am meisten bevorzugt in einem Zeitraum von 40 bis 80 h nach der Applikation.

Die positive Reaktion umfaßt vorzugsweise das Auftreten eines Knotens am Applikationsort und kann qualitativ durch visuelle Beobachtung oder/und durch Abtasten, aber auch quantitativ, z. B. durch Ultraschall oder fotografische Methoden, bestimmt werden.

Andererseits können auch Produkte einer positiven Reaktion, z. B. -Cytokine, wie etwa  $\gamma$ -Interferon, bestimmt werden, die durch infiltrierende Zellen, z. B. Leukozyten, am Applikationsort freigesetzt werden.

Das erfundungsgemäße Verfahren eignet sich insbesondere für die Diagnose von Autoimmunerkrankungen oder einer Prädisposition für Autoimmunerkrankungen.

Beispiele für Autoimmunerkrankungen, deren Diagnose durch das erfundungsgemäße Verfahren möglich ist, sind Diabetes mellitus, insbesondere Diabetes Typ I (IDDM), Multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis, Basedow-Krankheit, ankylosierende Spondylitis, akute anteriore Uveitis, Goodpasture-Syndrom, Myasthenia gravis, systemischer Lupus erythematoses, Pemphigus vulgaris, Immun-Thyreoiditis, Sklerodermie, Morbus Crohn, Sjögren-Syndrom, Morbus Reiter, Inflammatory Bowel Disease oder Graves Diserase. Besonders bevorzugt wird das erfundungsgemäße Verfahren zur Diagnose von T-Zell-vermittelten Erkrankungen eingesetzt, wie etwa IDDM, rheumatoide Arthritis oder Multiple Sklerose, am meisten bevorzugt wird das erfundungsgemäße Verfahren für die Diagnose von IDDM eingesetzt.

Als autoreaktive Substanzen zur Diagnose von IDDM verwendet man beispielsweise Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD) 65 kd oder 67 kd, Tyrosinphosphatase (38 kd Antigen), Carboxypeptidase H, Insulin, Heat Shock Protein, 38 kd Insulin-secretory-granule-protein oder Teile davon. Besonders bevorzugt verwendet man als autoreaktive Substanz humane GAD 65 kd oder Peptid-Teilsequenzen davon.

Analoge diagnostische Anwendungen sind jedoch auch bei anderen Autoimmunerkrankungen möglich. Beispiele derartiger Autoimmunerkrankungen sind Multiple Sklerose, wo reaktive T-Zellen z. B. gegen das Myelin Basic Protein oder das Proteolipid-Protein bestimmt werden können, rheumatoide Arthritis, wo reaktive T-Zellen z. B. gegen Kollagen Typ II, Cytokeratine, dnaJ Protein aus *E. coli* und Hsp 65 bestimmt werden können, und Basedow-Krankheit, wo reaktive T-Zellen z. B. gegen Thyroidperoxidase bestimmt werden können. Bei Myasthenia gravis können reaktive T-Zellen gegen den Acetylcholin-Rezeptor oder andere relevante autoreaktive Substanzen bestimmt werden. Bei Lupus erythematoses existieren reaktive T-Zellen gegen HSP 90 und bei Graves Disease gegen den TSH-Rezeptor.

Allgemein ist die diagnostische Anwendung bei allen Erkrankungen möglich, die das Immunsystem beeinflussen, wie z. B. auch bei der Arteriosklerose. Hier wurde eine Assoziation der Krankheit mit einer Immunantwort gegen das Heat Shock Protein Hsp 65 nachgewiesen (Xu et al, Lancet 341, 8840 (1993), 255–259).

Noch eine weitere Anwendung ist der diagnostische Nachweis von T-Zellen, die gegen Tumorantigene reagieren. Beispiele hierfür sind T-Zellen gegen ein Melanom-assoziiertes Antigen MAGE 1, die aus Melanom-patienten isoliert wurden (van der Bruggen et al, Science 254 (1991), 1643–1647). Der Nachweis dieser T-Zellen kann schon in einem Stadium erfolgen, in dem der Tumor aufgrund einer noch zu geringen Zellmasse mit herkömmlichen Methoden noch nicht nachweisbar ist. Ferner können der Nachweis von spezifisch reagierenden T-Zellen auch zur Verlaufskontrolle bei einer Anti-Tumorvakzinierung eingesetzt werden.

Weiterhin können auch Peptide, Peptid-Derivate oder analog bindende Moleküle als autoreaktive Substanzen eingesetzt werden. Für die Diagnose von IDDM verwendet man vorzugsweise ein oder mehrere Peptide aus GAD, insbesondere aus humaner GAD 65 kd oder davon abgeleitete Peptid-Derivate oder Peptidmimetika.

Besonders bevorzugt verwendet man für die Diagnose von IDDM Peptide oder Peptid-Derivate, umfassend:

- (a) die Aminosäuresequenz (I)  
D-V-N-Y-A-F-L-H-A-T-D-L-L-P-A-C-D-G-E-R,
- (b) die Aminosäuresequenz (II)  
S-N-M-Y-A-M-M-I-A-R-F-K-M-F-P-E-V-K-E-K,
- (c) die Aminosäuresequenz (III)  
N-W-E-L-A-D-Q-P-Q-N-L-E-E-I-L-M-H-C-Q-T,
- (d) die Aminosäuresequenz (IV)  
T-L-K-Y-A-I-K-T-G-H-P-R-Y-F-N-Q-L-S-T-G,
- (e) die Aminosäuresequenz (V)  
P-R-Y-F-N-Q-L-S-T-G-L-D-M-V-G-L-A-A-D-W,
- (f) die Aminosäuresequenz (VI)  
T-Y-E-I-A-P-V-F-V-L-L-E-Y-V-T-L-K-K-M-R,
- (g) die Aminosäuresequenz (VII)  
G-M-A-A-L-P-R-L-I-A-F-T-S-E-H-S-H-F-S-L-K-K-G-A-A,
- (h) die Aminosäuresequenz (VIII)  
E-R-G-K-M-I-P-S-D-L-E-R-R-I-L-E-A-K-Q-K,
- (i) eine der in Abb. 1 oder 2 dargestellten Aminosäuresequenzen,
- (j) Teilbereiche der in (a) bis (i) dargestellten Aminosäuresequenzen mit einer Länge von mindestens 6 Aminosäuren oder/und
- (k) Aminosäuresequenzen, die eine im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle wie die in (a) bis (j) dargestellten Aminosäuresequenzen zeigen.

Die Aminosäuresequenzen (I) bis (VI) entsprechen den Aminosäureresten 86–105 (I), 246–265 (II), 146–165 (III), 166–185 (IV), 176–195 (V) und 206–225 (VI) der humanen GAD 65 kd.

Die Aminosäuresequenz (VII) entspricht den Aminosäureresten 266–290 der humanen GAD 65 kd und die Aminosäuresequenz (VII) der Aminosäuresequenz 306–325 der humanen GAD 65 kd. Die in den Abb. 1 und 2 dargestellten Aminosäuresequenzen sind ebenfalls Teilsequenzen der humanen GAD 65 Kd.

Überraschenderweise wurde festgestellt, daß Peptide, welche die obengenannten Bereiche der humanen GAD 65 enthalten, eine spezifische Reaktion mit T-Zellsubpopulationen zeigten, die aus frisch entdeckten Typ I-Diabetikern isoliert wurden. Somit handelt es sich bei den erfundungsgemäßen Peptiden um frühe Autoepitope, mit deren Verwendung eine sehr frühe Diagnose des Typ I-Diabetes ermöglicht wird.

Die Aminosäuresequenzen (I) bis (VIII) sind Teilbereiche aus der 65 kd Isoform der humanen Glutaminsäure-

Decarboxylase (GAD), deren vollständige Aminosäuresequenz von Bu et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992), 2115ff.) beschrieben wurde. Die Aminosäuresequenzen (I) bis (VIII) wurden durch Anlegen von T-Zelllinien aus dem peripheren Blut von Typ I-Diabetikern und anschließende *in vitro* Stimulation mit GAD aus Schweinehirn bzw. rekombinanter humaner GAD und Testen dieser T-Zelllinien in einem Proliferationsassay mit synthetischen Peptidsequenzen gefunden, die aus der humanen GAD-Sequenz abgeleitet wurden.

Die Peptide können durch bekannte Syntheseverfahren mittels chemischer Methoden erzeugt werden oder durch Klonierung und Expression einer für diese Peptide codierenden DNA-Sequenz in einer geeigneten Wirtszelle, insbesondere *E. coli*, auf gentechnische Weise hergestellt werden.

Weiterhin bevorzugt sind auch Peptide mit Teilbereichen der spezifisch angegebenen Aminosäuresequenzen (I) bis (VIII) oder der in den Abb. 1 und 2 dargestellten Aminosäuresequenzen, die eine Länge von mindestens 6 Aminosäuren, vorzugsweise von mindestens 8 Aminosäuren, besonders bevorzugt von mindestens 10 Aminosäuren und am meisten bevorzugt von mindestens 15 Aminosäuren aufweisen. Die minimale Länge eines erfundungsgemäßen Peptids wird durch seine Fähigkeit bestimmt, ein MHC-Molekül zu erkennen, mit ihm spezifisch zu binden und mit dem entsprechenden T-Zellrezeptor zu reagieren.

Die maximale Länge der aus der GAD stammenden und MHC-bindenden Abschnitte in einem erfundungsgemäßen Peptid beträgt vorzugsweise 100 Aminosäuren, besonders bevorzugt 50 Aminosäuren und am meisten bevorzugt 25 Aminosäuren.

Neben den obengenannten Peptiden können auch Peptide verwendet werden, die im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle wie die zuvor genannten Sequenzen zeigen und die vorzugsweise durch Substitution, Deletion oder Insertion einzelner Aminosäurereste oder kurzer Abschnitte von Aminosäureresten aus den obengenannten Aminosäuresequenzen abgeleitet sind oder analog bindende verfremdete Substanzen.

Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung auch Peptidvarianten, die in ihrer Sequenz mit den oben genannten Aminosäuresequenzen nicht völlig übereinstimmen, sondern nur gleiche oder nahe verwandte "Ankerpositionen" aufweisen. Die Bezeichnung "Ankerposition" bedeutet in diesem Zusammenhang einen für die Bindung an ein MHC-Molekül, insbesondere an ein MHC-Molekül der Klassen DR3, DR4 oder DQ, wesentlichen Aminosäurerest. Die Ankerposition für das DRB10401-Bindungsmotiv sind z. B. bei Hammer et al, Cell 74 (1993), 197–203, angegeben. Derartige Ankerpositionen sind in erfundungsgemäßen Peptiden konserviert oder gegebenenfalls durch Aminosäurereste mit chemisch sehr nahe verwandten Seitenketten ersetzt (z. B. Alanin durch Valin, Leucin durch Isoleucin und umgekehrt). Die Bestimmung der Ankerpositionen in den erfundungsgemäßen Peptiden kann auf einfache Weise durch Tests von Varianten der oben angegebenen spezifischen Peptide auf ihre Bindungsfähigkeit an MHC-Moleküle erfolgen. Erfundungsgemäße Peptide sind dadurch gekennzeichnet, daß sie eine im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle wie die zuvor genannten Peptide zeigen. Vorzugsweise besitzen die aus diesen Peptiden abgeleiteten Peptide eine

Sequenzhomologie von mindestens 30%, besonders bevorzugt von mindestens 50% und am meisten bevorzugt mindestens 60% mit den Ausgangspeptiden oder Teilsequenzen davon.

Beispiele für Varianten der spezifisch angegebenen Peptide sind die entsprechenden homologen Peptidabschnitte aus der humanen GAD 67, deren vollständige Aminosäuresequenz ebenfalls von Bu et al, *supra*, beschrieben wurde.

Der Begriff "im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle" umfaßt auch eine gegenüber den Aminosäuresequenzen (I) bis (VIII) oder den in den Abb. 1 und 2 dargestellten Aminosäuresequenzen verbesserte Bindungsspezifität oder/und -affinität, die insbesondere bei verkürzten Peptiden gefunden wird, die eine Länge von vorzugsweise 8 bis 15 Aminosäuren besitzen.

Weiterhin umfaßt die vorliegende Erfindung auch Peptid-Derivate. Dieser Begriff umfaßt Peptide, in denen eine oder mehrere Aminosäuren durch eine chemische Reaktion derivatisiert worden sind. Beispiele von erfundungsgemäßen Peptid-Derivaten sind insbesondere solche Moleküle, in denen das Backbone oder/und reaktive Aminosäureseitengruppen, z. B. freie Aminogruppen, freie Carboxylgruppen oder/und freie Hydroxylgruppen, derivatisiert worden sind. Spezifische Beispiele für Derivate von Aminogruppen sind Sulfonsäure- oder Carbonsäureamide, Thiourethanderivate und Ammoniumsalze, z. B. Hydrochloride. Beispiele für Carboxylgruppenderivate sind Salze, Ester und Amide. Beispiele für Hydroxylgruppenderivate sind O-Acyl- oder O-Alkylderivate. Weiterhin umfaßt der Begriff Peptid-Derivat gemäß vorliegender Erfindung auch solche Peptide, in denen eine oder mehrere Aminosäuren durch natürlich vorkommende oder nicht natürlich vorkommende Aminosäurehomologe der 20 "Standard"-Aminosäuren ersetzt werden. Beispiele für solche Homologe sind 4-Hydroxyprolin, 5-Hydroxylysin, 3-Methylhistidin, Homoserin, Ornithin,  $\beta$ -Alanin und 4-Aminobuttersäure.

Weitere geeignete Peptid-Derivate sind Komplexe oder kovalente Verbindungen zwischen Peptiden und adjuvanten Komponenten, die gemeinsam mit dem Autoantigen verabreicht werden, z. B. Lipiden. Die Peptide können in diesem Fall als Lipopeptide eingesetzt werden.

Von der vorliegenden Erfindung werden auch Polypeptide erfaßt, in denen der MHC-bindende Peptidabschnitt Bestandteil einer größeren Polypeptideinheit ist, wobei die Verbindung von MHC-bindendem Peptid und dem Rest der Polypeptideinheit vorzugsweise eine Sollbruchstelle aufweist, z. B. eine Proteasespaltstelle.

Die Erfindung betrifft auch peptidmimetische Substanzen, die eine im wesentlichen äquivalente Spezifität oder/und Affinität der Bindung an MHC-Moleküle wie die zuvor genannten Peptide oder Peptid-Derivate zeigen. Peptidmimetische Substanzen oder Peptidmimetika sind Verbindungen, die Peptide in ihrer Wechselwirkung mit den MHC-Molekülen ersetzen können und gegenüber den nativen Peptiden eine erhöhte metabolische Stabilität, bessere Bioverfügbarkeit und größere Wirkungsdauer aufweisen können. Methoden zur Herstellung von Peptidmimetika sind beschrieben bei Giannis und Kolter, *Angew. Chem.* 105 (1993), 1303–1326, Lee et al, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 66 (1993), 2006–2010 und Dorsch et al, *Kontakte* (Darmstadt) (1993) (2), 48–56. Bezuglich der Herstellung erfundungsgemäßer peptidmimetischer Substanzen wird auf die Offenbarung dieser Literaturstellen verwiesen.

Weiterhin als autoreaktive Substanz geeignet ist ein Komplex, der mindestens ein Peptid, Peptid-Derivat oder Peptidmimetikum und mindestens ein MHC-Molekül oder ein peptidbindendes Derivat eines MHC-Moleküls umfaßt. In diesem Komplex ist ein Peptid, Peptid-Derivat oder Peptidmimetikum mit einer Bindungskonstante von vorzugsweise mindestens  $10^{-7}$  l/mol, besonders bevorzugt im Bereich von  $10^{-8}$ – $10^{-9}$  l/mol, an ein MHC-Molekül oder ein peptidbindendes Derivat eines MHC-Moleküls gebunden. Alternativ kann das Peptid, Peptid-Derivat oder Peptidmimetikum auch kovalent an das MHC-Molekül gekoppelt sein, z. B. über einen Photolinker oder als kovalente genetische Peptid-MHC-Fusion. Ein derartiges Peptid-MHC-Fusionsprotein enthält vorzugsweise eine HLA-DR beta-Kette und ein damit genetisch fusioniertes autoreaktives Peptid. Besonders bevorzugt enthält der Komplex ein MHC-Klasse II-Molekül oder ein peptidbindendes Derivat davon.

Die Nukleotidsequenzen der für MHC-Klasse II-Moleküle kodierenden Gene sind veröffentlicht in Corell et al (*Mol. Immunol.* 28 (1991), 533–543). Auf den Inhalt dieser Publikation wird hiermit Bezug genommen.

Der Begriff "peptibindendes Derivat eines MHC-Moleküls" umfaßt Fragmente von MHC-Molekülen, die durch proteolytische Spaltung nativer MHC-Moleküle oder durch rekombinante DNA-Techniken hergestellt sind und ihre peptibindenden Eigenschaften im wesentlichen beibehalten haben. Weiterhin sind unter diesem Begriff Fusionsproteine zu verstehen, die neben einem für die Peptidbindung verantwortlichen MHC-Anteil noch weitere Polypeptid-Komponenten enthalten.

Die Peptid-MHC-Komplexe werden vorzugsweise durch Assoziation peptidfreier MHC-Moleküle oder MHC-Molekülderivate mit den erfundungsgemäßen Peptiden, Peptid-Derivaten oder Peptidmimetika hergestellt. Die Herstellung von peptidfreien MHC-Molekülen kann beispielsweise durch Entfaltung von nativen MHC-Molekülen, um gebundene Peptide zu dissoziieren, und Rückfaltung der leeren MHC-Moleküle erfolgen (siehe Dormair und McConnell, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990), 4134–4138 und WO91/14701). Weitere Methoden zur Herstellung von Komplexen aus Peptiden und MHC-Molekülen sind in der europäischen Patentanmeldung Nr. 95 100 764.0 beschrieben. Auf diese Offenbarung wird hiermit Bezug genommen.

Die Erfindung betrifft auch die Verwendung einer Zusammensetzung, die eine autoreaktive Substanz, z. B. ein Protein, Polypeptid, Peptid, Peptid-Derivat, Peptidmimetikum oder/und einen Peptid-MHC-Komplex als aktive Komponente gegebenenfalls in Kombination mit Adjuvanten oder anderen pharmazeutisch üblichen Zusatzstoffen enthält, in einem diagnostischen Verfahren, welches die intradermale Applifizierung der Zusammensetzung umfaßt. Die Zusammensetzung kann weiterhin eine akzessorische stimulierende Komponente enthalten, z. B. Cytokine wie IL-2 und IL-4 oder/und das Oberflächenantigen B7 (Wyss-Coray et al, *Eur. J. Immunol.* 23 (1993), 2175–2180; Freeman et al, *Science* 262 (1993), 909–911), das mit dem Oberflächenmolekül CD-28 auf einer T-Zelle binden kann. Die Anwesenheit der akzessorischen stimulierenden Komponente kann die diagnostische Wirkung der Zusammensetzung verbessern oder/und modifizieren.

Weiterhin ist es bevorzugt, daß man beim erfundungsgemäßen Verfahren zusätzliche Bestimmungen mit positiven oder/und negativen Kontrollen durchführt. Als negative Kontrollen kann man beispielsweise ein nicht-reaktives Polypeptid, wie etwa humanes Serumalbumin oder eine nur Zusatzstoffe, z. B. den Puffer, enthaltende Präparation verwenden. Als positives Kontroll-Antigen kann man beispielsweise gereinigtes Protein-Derivat (PPD) aus dem Kulturmedium, in dem Tuberkelbakterien gezüchtet werden (kommerziell erhältlich, z. B. von Statens Serum Institut, Kopenhagen, Dänemark) oder Tetanus-Toxoid verwenden, von denen bekannt ist, daß sie bei vielen Personen eine starke T-Zellstimulierung hervorrufen.

Weiterhin ist es bei bestimmten Ausführungsformen der Erfindung bevorzugt, wenn man die autoreaktiven Substanzen gemeinsam mit einem Adjuvans appliziert. Beispiele für geeignete Adjuvantien sind Aluminiumhydroxid, inkomplettes Freund'sches Adjuvans, Aluminiumphosphat und zur Kopplung von Peptiden geeignete Lipide (Lipopeptide).

Die Applikation der autoreaktiven Substanzen kann nach an sich bekannten Verfahren erfolgen, wobei eine z. B. normale Injektionsspritze z. B. mit einer Nadel der Größe 26G verwendet wird. Die die autoreaktive Substanz enthaltende Zusammensetzung wird vorzugsweise in einem Volumen von 20 µl bis 500 µl vorzugsweise 50 µl bis 200 µl an einem geeigneten Ort des Körpers intracutan appliziert, der am besten für das den Zellen des Immunsystems präsentierte Autoantigen geeignet ist. Zur Diagnose von IDDM kann die Applikation beispielsweise in den Unterarm (Vorderseite) erfolgen.

Die Konzentration des Autoantigens in der Zusammensetzung kann in Abhängigkeit von den jeweils verwendeten Autoantigenen in breiten Bereichen variieren. Vorzugsweise werden Konzentrationen von 1 bis 20 100 µg/ml, insbesondere von 5 bis 20 µg/ml verwendet.

Weiterhin ist es möglich, daß man die Applikation in einer Vorrichtung durchführt, die mindestens eine Kammer zur Aufnahme einer Präparation mit autoreaktiven Substanzen, eine Kammer zur Aufnahme einer Präparation für die positive Kontrolle und eine Kammer zur Aufnahme einer Präparation für die negative Kontrolle umfaßt. Eine derartige Vorrichtung kann beispielsweise 2 bis 10 Kammern zur Aufnahme von Präparationen mit autoreaktiven Substanzen enthalten. Mit dieser Vorrichtung können mehrere autoreaktive Substanzen auf einfache Weise simultan getestet werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Bestimmung einer spezifischen T-Zell-Subpopulation, wobei man eine T-Zellen enthaltende Probe, die vorzugsweise aus einer Gewebeprobe aus dem Bereich des Applikationsorts stammt, mit einer autoreaktiven Substanz in Kontakt bringt und die Reaktion von T-Zellen mit der Substanz bestimmt. Eine spezifische Reaktion von T-Zellen mit dem Autoantigen kann z. B. durch eine erhöhte T-Zellproliferation nachgewiesen werden, die sich durch den Einbau von Radioaktivität messen läßt. Andererseits kann die Reaktion von T-Zellen auch direkt durch Verwendung eines markierten Autoantigens, z. B. in Komplexform mit einem löslichen MHC-Molekül, bestimmt werden. Bei dieser Ausführungsform wird die autoreaktive Substanz vorzugsweise mit einer daran gekoppelten Fluoreszenzmarkierungsgruppe verwendet. Die Auswertung kann beispielsweise durch FACS-Analyse erfolgen, wobei die T-Zellen mit einem ersten Fluoreszenzmarker, der an einen T-Zell-spezifischen Antikörper gekoppelt ist, und dann mit dem Autoantigen, das mit einem zweiten Fluoreszenzmarker gekoppelt ist, in Kontakt gebracht werden und das Vorhandensein von doppelmarkierten Zellen durch fluorographische Analyse bestimmt wird. Auf diese Weise wird eine T-Zell-Subpopulation bestimmt, die durch ihre Reaktivität mit einem Autoantigen charakterisiert ist. Das Verfahren kann gegebenenfalls auch eine Selektion auf präaktivierte T-Zellen, z. B. eine selektive Anreicherung von IL-2-Rezeptor-positiven T-Zellen durch Inkubation mit IL-2 oder/und durch Inkubation mit IL-2-Rezeptor-Antikörper und anschließende Separation der Antikörper-bindenden Zellen beispielsweise mit immunmagnetischen Methoden umfassen. Andererseits kann die Selektion auf präaktivierte Zellen erst nach dem Kontakt der T-Zellen mit dem Autoantigen erfolgen.

In einer Abwandlung dieses Verfahrens kann auch das Verhältnis von präaktivierten autoreaktiven T-Zellen, d. h. T-Zellen mit dem IL-2-Rezeptor als Oberflächenmarker, zu nicht-aktivierten autoreaktiven T-Zellen, d. h. T-Zellen ohne den IL-2-Rezeptor, bestimmt werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist die Isolierung von T-Zellsubpopulationen, die mit einem Autoantigen reagieren. Bei einem solchen Verfahren bringt man eine T-Zellen enthaltende Gewebeprobe, die aus dem Bereich des Applikationsorts stammt, mit einem Autoantigen in Kontakt, identifiziert die mit Autoantigenen reagierenden T-Zellen und trennt sie gegebenenfalls von anderen T-Zellen ab. Auch hier kann vor oder/und nach dem Kontakt der T-Zellen mit dem Autoantigen eine Selektion auf präaktivierte T-Zellen, d. h. T-Zellen mit dem IL-2-Rezeptor, erfolgen. Bei einem solchen Verfahren kann man das Autoantigen, z. B. in Form eines Komplexes mit einem MHC-Molekül, in immobilisierter Form auf einem Träger verwenden, wodurch die Abtrennung der positiv reagierenden T-Zell-Population von anderen T-Zellen vereinfacht wird. Aus den auf diese Weise isolierten T-Zell-Subpopulationen können durch Restimulation T-Zelllinien angelegt werden. Diese autoreaktive T-Zelllinien können dann zur Immunisierung von Patienten verwendet werden.

Bei den diagnostischen Verfahren zur Identifizierung von spezifischen T-Zellsubpopulationen kann anstelle der Autoantigene auch ein anti-idiotypischer Antikörper verwendet werden, der die Wirkung des MHC-Peptid-Komplexes nachahmt. Derartige Antikörper können ohne weiteres erhalten werden, indem eine gegen ein bestimmtes Antigen spezifische T-Zellsubpopulation als Immunogen zur Erzeugung eines Antikörpers (z. B. in einer Maus) verwendet wird oder indem zuerst ein erster Antikörper gegen das Autoantigen und dann ein anti-idiotypischer Antikörper gegen den ersten Antikörper erzeugt wird.

Zur Identifizierung von spezifischen T-Zellsubpopulationen kann anstelle der Isolierung der T-Zellen auch die Identifizierung der Produkte dieser in vivo aktivierte T-Zellen erfolgen. Dies kann durch Entnahme einer Gewebeprobe (z. B. Feinnadelaspirat) und Bestimmung der darin enthaltenden Cytokine erfolgen. Alternativ kann die Cytokin-Bestimmung auch in situ erfolgen durch längeres Auflegen eines Pflasters, in dem Antikörper gegen verschiedene Cytokine immobilisiert sind. Der Nachweis der Cytokine erfolgt nach gängigen Verfahren

eines Festphasen-Immunoassays unter Verwendung von Enzymsubstraten, die ein unlösliches farbiges Produkt liefern, welches entweder ohne weitere Hilfe oder unter Verwendung eines Scanners abgelesen werden kann.

Schließlich betrifft die Erfindung ein Reagenzienkit zur in vivo Diagnose von zellulär vermittelten Erkrankungen oder einer Prädisposition dafür, umfassend:

- (a) mindestens eine autoreaktive Substanz in Form einer pharmazeutisch verträglichen Zusammensetzung,
- (b) gegebenenfalls mindestens eine Kontrollsubstanz in Form einer pharmazeutisch verträglichen Zusammensetzung,
- (c) Mittel zur intradermalen Applikation der autoreaktiven Substanz und der Kontrollsubstanz und
- (d) gegebenenfalls Mittel zur diagnostischen Auswertung des Testresultats.

Die Zusammensetzungen für die autoreaktive Substanz und die Kontrollsubstanz enthalten vorzugsweise Adjuvantien und gegebenenfalls andere übliche pharmazeutische Träger-, Verdünnungs- und Zusatzstoffe.

Weiter soll die Erfindung durch die folgenden Beispiele in Verbindung mit den Abb. 1 und 2 erläutert werden.

Abb. 1 zeigt autoreaktive Aminosäuresequenzen aus humaner GAD 65 kd und  
Abb. 2 zeigt weitere autoreaktive Aminosäuresequenzen aus humaner GAD 65 kd.

#### Beispiel 1

##### (Vergleichsbeispiel)

20

##### In vitro Untersuchung

Das periphere venöse Blut von acht, erst seit kurzem erkrankten IDDM-Patienten und zwölf gesunden Personen wurde gesammelt. Die peripheren Blutzlymphozyten wurden durch Ficoll-Hypaque-Dichtegradienten- 25 zentrifugation isoliert und für eine in vitro Stimulation verwendet mit:

- a) rekombinanter humaner GAD 65 kd als Testantigen;
- b) gereinigtem Protein-Derivat (PPD) als positivem Kontroll-Antigen;
- c) humanem Serum Albumin (HSA) als negativem Kontroll-Antigen.

30

$1 \times 10^5$  periphere Blutzlymphozyten (PBL) wurden in einem Napf einer 96 Napf-Rundbodenplatte für 5 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in 100 µl eines Kulturmediums (RPMI 1640 Medium, 5% Humanserum, 2 mmol/l Glutamin, 10 U/ml Penicillin, 10 µg/ml Streptomycin und 50 nmol/l 2-Mercaptoethanol) in Gegenwart der obengenannten Antigene oder in Medium alleine inkubiert.

Nach 5 Tagen wurden 20 µl RPMI 1640 Medium mit 0,5 µCi <sup>3</sup>H Thymidin pro Napf zugesetzt. Die Inkubation wurde für 16 Stunden fortgeführt und dann die Zellen abgeertnet. Der Einbau von Thymidin wurde durch Flüssigszintillationszählung gemessen. Die Ergebnisse sind als Stimulationsindex (SI, d. h. cpm in Gegenwart des Antigens dividiert durch cpm in Abwesenheit des Antigens, d. h. (Medium alleine) angegeben.

Die Proliferationsreaktionen von Lymphozyten aus IDDM-Patienten und Kontrollpersonen gegenüber den einzelnen Antigenen sind in Tabelle 1 bzw. 2 zusammengefaßt.

Tabelle 1

IDDM-Patienten	Basiswert cpm	S.I.=cpm PBL stimuliert/ cpm PBL nicht stimuliert		
		PPD 10 µg/ml	rhGAD 65 10 µg/ml	HSA 10 µg/ml
1	730	17.9	2.6	1.1
2	833	16.7	8.8	1.2
3	639	23	6.6	0.9
4	328	28.9	0.8	2.9
5	1211	10.6	1.9	0.5
6	1041	11.9	1.8	2.2
7	520	19.8	7.2	1.0
8	412	2.7	8.3	0.8

Tabelle 2

5 gesunde Personen	Basiswert cpm	S.I.=cpm PBL stimuliert/ cpm PBL nicht stimuliert		
		PPD 10 $\mu$ g/ml	rhGAD 65 10 $\mu$ g/ml	HSA 10 $\mu$ g/ml
10 1	1108	25	1.8	0.7
2	1035	2.1	3.0	0.5
3	390	6.5	2.7	1.1
4	578	6.2	0.9	1.2
5	243	1.3	0.9	1.9
6	375	6.3	2.5	2.6
7	648	12.5	4.2	0.8
8	730	20.6	4.2	0.5
9	542	0.8	0.9	2.0
10	915	0.5	2.8	2.8
11	567	90.6	3.5	2.3
12	1247	12.5	1.0	0.6

30 Eine statistische Analyse der Untersuchung ergab, daß Proliferation von PBL aus vor kurzem diagnostizierten IDDM-Patienten mit rhGAD 65 kd bei einem SI von mehr als 4,7 (Mittelwert der Kontrollpersonen + 2 SD) als positiv angesehen werden konnte.

35 Eine in vitro T-Zellreaktion gegen rhGAD 65 kd wurde somit bei 50% der IDDM-Patienten beobachtet (Patienten 2, 3, 7 und 8). Bei den Patienten 1, 2, 4 und 8 konnten Antikörper gegen GAD festgestellt werden, aber nicht bei den Patienten 3 und 5. Die Patienten 6 und 7 wurden nicht auf Antikörper gegen GAD getestet. Die Kontrollpersonen zeigen keine Reaktion gegen GAD 65 kd.

40 Die Reaktion der Diabetiker und der Kontrollpersonen gegenüber den Kontrollen HSA und PPD zeigte keinerlei statistisch signifikanten Unterschied.

### Beispiel 2

#### 45 In vivo Untersuchung

Den acht IDDM-Patienten aus Beispiel 1 wurden in den rechten Vorderarm 100  $\mu$ l rhGAD 65 kd mit einer Konzentration von 10  $\mu$ g/ml intradermal injiziert.

50 Das Antigen war in physiologischer Salzlösung pH 7,3 und 1% HSA verdünnt. Ein gleiches Volumen (100  $\mu$ l) HSA mit einer Konzentration von 10  $\mu$ g/ml wurde in den rechten Oberarm als negative Kontrolle injiziert.

55 PPD wurde als positives Kontroll-Antigen bei 5 der 12 IDDM-Patienten verwendet. HSA wurde bei allen Patienten als negative Kontrolle verwendet.

Für die in vivo Diagnose wurde die Ausbildung eines Knotens (spezifische Zunahme der Dermadicke) am Applikationsort als positive Reaktion angesehen. Die Diagnose erfolgte 48 h nach der Applikation. Die Ergebnisse wurden durch Ultraschallmessungen im Bereich des Applikationsorts bestätigt und quantifiziert. Es wurden keine Nebenreaktionen beobachtet.

60 Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in Tabelle 3 dargestellt.

65

Tabelle 3

IDDM-Pa-tienten	PPD 10 $\mu$ ml	rhGAD 65 10 $\mu$ g/ml	HSA 10 $\mu$ g/ml	Zeitpunkt d. Auswer-tung
1	+	++	-	48h
2	-	++	-	48h
3	-	+	-	48h
4	-	-	-	48h
5	-	-	-	48h
6	-	-	-	48h
7	-	+++	-	48h
8	+	+	-	48h

Fünf der acht getesteten IDDM-Patienten zeigen eine positive Reaktion gegen rhGAD 65.

25  
Patentansprüche

1. Verwendung von autoreaktiven Substanzen zur Herstellung eines Mittels für die Diagnose von zellulär vermittelten Erkrankungen oder einer Prädisposition für zellulär vermittelte Erkrankungen, wobei man das Mittel intradermal appliziert und die Diagnose auf Basis des Auftretens oder Fehlens einer positiven Reaktion am Applikationsort stellt. 30
2. Verwendung nach Anspruch 1 für die Diagnose von Autoimmunerkrankungen oder einer Prädisposition für Autoimmunerkrankungen.
3. Verwendung nach Anspruch 1 für die Diagnose von Tumorerkrankungen oder einer Prädisposition für Tumorerkrankungen. 35
4. Verwendung nach Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß man als autoreaktive Substanzen Nukleinsäuren, Lipide, Saccharide, Proteine, Polypeptide sowie Komplexe, immunogene Epitope, Fragmente, Analoga, Mimetika oder Derivate davon sowie Mischungen davon gegebenenfalls in trägegebundener Form verwendet.
5. Verwendung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß man als autoreaktive Substanzen Peptide, Peptid-Derivate oder Peptidmimetika gegebenenfalls in Form von Komplexen mit MHC-Molekülen oder peptidbindenden Derivaten davon verwendet. 40
6. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, für die Diagnose von Diabetes mellitus, Multiple Sklerose, rheumatoide Arthritis, Basedow-Krankheit, ankylosierende Spondylitis, akute anteriore Uveitis, Goodpasture-Syndrom, Myasthenia gravis, systemischer Lupus erythematoses, Pemphigus vulgaris, Immun-Thyreoiditis, Sklerodermie, Morbus Crohn, Sjögren-Syndrom, Morbus Reiter, Inflammatory Bowel Disease oder Graves Disease. 45
7. Verwendung nach Anspruch 6 für die Diagnose von Diabetes Typ I (IDDM).
8. Verwendung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man als autoreaktive Substanzen Glutaminsäure-Decarboxylase (GAD) oder Teile davon verwendet. 50
9. Verwendung nach Anspruch 7 oder 8, dadurch gekennzeichnet, daß man als autoreaktive Substanz humane GAD 65 kd verwendet.
10. Verwendung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß man als autoreaktive Substanz ein oder mehrere Peptide aus GAD oder davon abgeleitete Peptid-Derivate oder Peptidmimetika gegebenenfalls in Form von Komplexen mit MHC-Molekülen oder peptidbindenden Derivaten davon verwendet. 55
11. Verwendung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß man Peptide oder Peptid-Derivate verwendet, umfassend:
  - (a) die Aminosäuresequenz (I)  
D-V-N-Y-A-F-L-H-A-T-D-L-L-P-A-C-D-G-E-R,
  - (b) die Aminosäuresequenz (II)  
S-N-M-Y-A-M-M-I-A-R-F-K-M-F-P-E-V-K-E-K,
  - (c) die Aminosäuresequenz (III)  
N-W-E-L-A-D-Q-P-Q-N-L-E-E-I-L-M-H-C-Q-T,
  - (d) die Aminosäuresequenz (IV)  
T-L-K-Y-A-I-K-T-G-H-P-R-Y-F-N-Q-L-S-T-G,
  - (e) die Aminosäuresequenz (V)  
P-R-Y-F-N-Q-L-S-T-G-L-D-M-V-G-L-A-A-D-W,
  - (f) die Aminosäuresequenz (VI)

T-Y-E-I-A-P-V-F-V-L-L-E-Y-V-T-L-K-K-M-R,  
 (g) die Aminosäuresequenz (VII)  
 G-M-A-A-L-P-R-L-I-A-F-T-S-E-H-S-H-F-S-L-K-K-G-A-A,  
 (h) die Aminosäuresequenz (VIII)  
 5 E-R-G-K-M-I-P-S-D-L-E-R-R-I-L-E-A-K-Q-K,  
 (i) eine der in Abb. 1 oder 2 dargestellten Aminosäuresequenzen,  
 (j) Teilbereiche der in (a) bis (i) dargestellten Aminosäuresequenzen mit einer Länge von mindestens 6  
 Aminosäuren oder/und  
 10 (k) Aminosäuresequenzen, die eine im wesentlichen äquivalente Spezialität oder/und Affinität der  
 Bindung an MHC-Moleküle wie die in (a) bis (j) dargestellten Aminosäuresequenzen zeigen.

12. Verwendung nach einem der Ansprüche 5, 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Peptide oder Peptid-Derivate eine Länge von mindestens 8 Aminosäuren aufweisen.

13. Verwendung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Peptide oder Peptid-Derivate eine Länge von mindestens 10 Aminosäuren aufweisen.

14. Verwendung nach einem der Ansprüche 5, 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß die Peptide oder Peptid-Derivate eine Länge von bis zu 25 Aminosäuren aufweisen.

15. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die positive Reaktion zu einem Zeitpunkt von mindestens 24 h nach der Applikation bestimmt wird.

16. Verwendung nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die positive Reaktion in einem Zeitraum von 24 h bis 1 Woche nach der Applikation bestimmt wird.

17. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß eine positive Reaktion durch das Auftreten eines Knotens am Applikationsort bestimmt wird.

18. Verwendung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß man die positive Reaktion durch visuelle Beobachtung des Applikationsorts oder/und Abtasten der betreffenden Hautregion bestimmt.

19. Verwendung nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß man die positive Reaktion quantitativ, vorzugsweise durch Ultraschall oder durch fotografische Methoden bestimmt.

20. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß eine positive Reaktion durch Nachweis von Substanzen bestimmt wird, die durch infiltrierende Zellen am Applikationsort freigesetzt werden.

21. Verwendung nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß man Cytokine bestimmt.

22. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man zusätzliche Bestimmungen mit positiven oder/ und negativen Kontrollen durchführt.

23. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die autoreaktiven Substanzen gemeinsam mit einem Adjuvans appliziert.

24. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß man die Applikation in einer Vorrichtung durchführt, die mindestens eine Kammer zur Aufnahme einer Präparation mit autoreaktiven Substanzen, eine Kammer zur Aufnahme einer Präparation für die positive Kontrolle und eine Kammer zur Aufnahme einer Präparation für die negative Kontrolle umfaßt.

25. Verwendung nach einem der vorhergehenden Ansprüche, weiterhin umfassend die Bestimmung oder Isolierung einer spezifischen autoreaktiven T-Zellsubpopulation, wobei man eine Gewebeprobe aus dem Bereich des Applikationsorts mit einer autoreaktiven Substanz in Kontakt bringt, die mit der autoreaktiven Substanz reagierenden T-Zellen identifiziert und gegebenenfalls von anderen T-Zellen abtrennt.

40 26. Verfahren zur in vivo Diagnostik von zellulär vermittelten Erkrankungen oder einer Prädisposition für zellulär vermittelte Erkrankungen, wobei man eine autoreaktive Substanz intradermal appliziert und die Diagnose auf Basis des Auftretens oder Fehlens einer positiven Reaktion am Applikationsort erstellt.

45 27. Reagenzienkit zur in vivo Diagnose von zellulär vermittelten Erkrankungen oder einer Prädisposition dafür, umfassend:  
 (a) mindestens eine autoreaktive Substanz in Form einer pharmazeutisch verträglichen Zusammensetzung,  
 (b) gegebenenfalls mindestens eine Kontrollsubstanz in Form einer pharmazeutisch verträglichen Zusammensetzung,  
 50 (c) Mittel zur intradermalen Applikation der autoreaktiven Substanz und der Kontrollsubstanz und  
 (d) gegebenenfalls Mittel zur diagnostischen Auswertung des Testresultats.

55 28. Reagenzienkit nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß die Zusammensetzungen für die autoreaktive Substanz und die Kontrollsubstanz Adjuvantien enthalten.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

Abb. 1

I-L-I-K-C-D-E-R-G-K-M-I-P-S

L-G-I-G-T-D-S-V-I-L-I-K-C-D

L-A-F-L-Q-D-V-M-N-I-L-L-Q-Y

Y-D-L-S-Y-D-T-G-D-K-A-L-Q-C

## Abb. 2

V-S-Y-Q-P-L-G-D-K-V-N-F-F-R

L-A-A-D-W-L-T-S-T-A-N-T-N-M

L-L-Y-G-D-A-E-K-P-A-E-S-G-G

V-N-Y-A-F-L-H-A-T-D-L-L-P-A

L-L-Q-Y-V-V-K-S-F-D-R-S-T-K

F-T-Y-E-I-A-P-V-F-V-L-L-E-Y

L-E-Y-V-T-L-K-K-M-R-E-I-I-G

N-M-Y-A-M-M-I-A-R-F-K-M-F-P

K-I-W-M-H-V-D-A-A-W-G-G-G-L

W-G-G-G-L-L-M-S-R-K-H-K-W-K

E-G-Y-E-M-V-F-D-G-K-P-Q-H-T

R-Y-F-N-Q-L-S-T-G-L-D-M-V-G

W-L-T-S-T-A-N-T-N-M-F-T-Y-E

T-A-N-T-N-M-F-T-Y-E-I-A-P-V

L-V-S-A-T-A-G-T-T-V-Y-G-A-F

Y-I-P-P-S-L-R-T-L-E-D-N-E-E

V-I-S-N-P-A-A-T-H-Q-D-I-D-F